

10/520659

PCT/JP03/08785

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

13.08.03

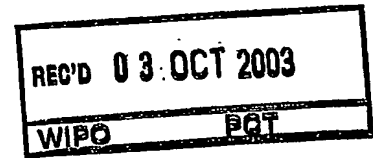
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 7月10日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-201843  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2002-201843]

出願人 生化学工業株式会社  
Applicant(s):

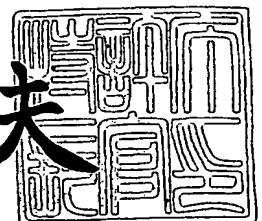


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J200202100

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/70

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県名古屋市昭和区八事富士見 7 0 3 番地

    【氏名】 羽瀨 脩躬

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢 1 愛知教育大学内

    【氏名】 中野 博文

【特許出願人】

    【識別番号】 000195524

    【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100120606

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 五丁 龍志

    【電話番号】 03-3270-0465

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 062307

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

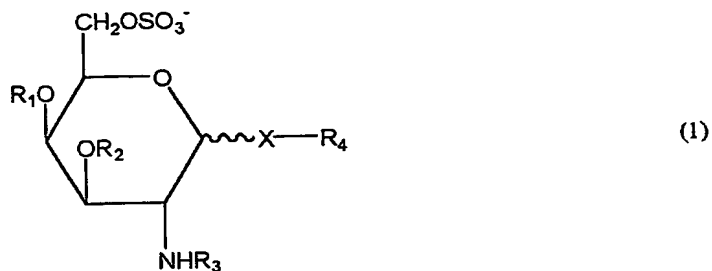
    【包括委任状番号】 0118594

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書  
【発明の名称】 硫酸基転移酵素阻害剤  
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式 1 で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体。

【化 1】



式中 $R_1$ 及び $R_2$ は各々独立に $SO_3^-$ 又はHを示し、 $R_3$ はH、アセチル基又は $SO_3^-$ を示し、 $R_4$ はH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基を示し、XはO、S、NH、又は $CH_2$ を示す。

【請求項 2】  $R_1$ 及び $R_2$ がHであり、 $R_3$ がアセチル基であり、 $R_4$ がアリール基であることを特徴とする請求項 1 記載のガラクトサミン誘導体。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載のガラクトサミン誘導体を含む硫酸基転移酵素阻害剤。

【請求項 4】 コンドロイチン硫酸の基本骨格中の4硫酸化ガラクトサミン残基の6位炭素原子に結合したヒドロキシル基へ硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素の前記活性を阻害することを特徴とする請求項 3 記載の硫酸基転移酵素阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は硫酸基転移酵素の阻害剤に関し、更に詳細にはグリコサミノグリカン的一种であるコンドロイチン硫酸の基本骨格に含まれる4硫酸化ガラクトサミン残基の6位炭素原子に結合したヒドロキシル基を硫酸化する働きを有する硫酸基転移酵素の阻害剤に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術】

コンドロイチン硫酸はグルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンとが1-3グリコシド結合で結合した二糖が1-4グリコシド結合で連なった骨格（本明細書中においては「基本骨格」とも記載する）を有する多糖である、グリコサミノグリカンの一種である。

## 【0003】

このようなコンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカンをはじめ、プロテオグリカン、糖タンパク質及び糖脂質は硫酸基を有しているものが多く、その生合成には多くの硫酸基転移酵素が関与している。特にJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900に記載された酵素や、それによって生ずるいわゆるコンドロイチン硫酸E (J. Biol. Chem., vol.264(1989), pp.14916-14922) 等は、近年免疫系・神経系に深く関与していることが示唆されており、当該酵素の阻害剤は免疫抑制剤（例えばアトピー性皮膚炎、喘息、クローン病の治療薬等）や神経調節剤（神経症、アルツハイマー、躁鬱症、精神病、自律神経失調症、神経性腸炎等の治療薬、神経修復調節剤等）に応用できる可能性が高い。

## 【0004】

このような硫酸基転移酵素の阻害剤としては例えばchlorate (Biochem. Biophys. Res. Commun., 150(1988), pp.342-348) やbrefeldinA (J. Biol. Chem., 267(1992), pp.8802-8806) 等が存在する。しかし、前者は硫酸基との拮抗作用として、後者は糖鎖合成の場であるゴルジ体を破壊することにより、コンドロイチン硫酸のみならず他のグリコサミノグリカンや糖タンパク質の生合成までも強力に阻害してしまう働きがあるため、治療薬として利用できる可能性が極めて低かった。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

そこで、特定の硫酸基転移酵素に対して特異性の高い阻害活性を有する新規の化合物、及びそれを用いた新たな硫酸基転移酵素阻害剤が求められていた。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者等は上記課題の解決のために鋭意検討した結果、6硫酸化ガラクトサミンのアノメリック炭素にグリコシド結合でアグリコン分子が結合してなる「6硫酸化ガラクトサミン誘導体」が優れた硫酸基阻害活性を有することを見いだし、本発明を完成した。

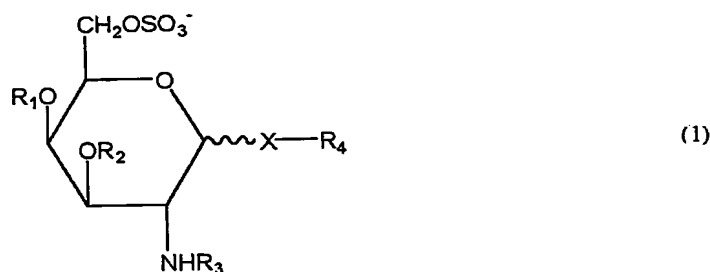
## 【0007】

すなわち本発明は以下の通りである。

(1) 下記式1で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体。

## 【0008】

## 【化2】



## 【0009】

式中 $R_1$ 及び $R_2$ は各々独立に $SO_3^-$ 又はHを示し、 $R_3$ はH、アセチル基又は $SO_3^-$ を示し、 $R_4$ はH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基を示し、XはO、S、NH、又は $CH_2$ を示す。

(2)  $R_1$ 及び $R_2$ がHであり、 $R_3$ がアセチル基であり、 $R_4$ がアリール基であることを特徴とする(1)記載のガラクトサミン誘導体。

(3) (1)又は(2)記載のガラクトサミン誘導体を含む硫酸基転移酵素阻害剤。

(4) コンドロイチン硫酸の基本骨格中の4硫酸化ガラクトサミン残基の6位炭素原子に結合したヒドロキシル基へ硫酸基を転移する活性を有する硫酸基転移酵素の前記活性を阻害することを特徴とする(3)記載の硫酸基転移酵素阻害剤。

## 【0010】

## 【発明の実施の形態】

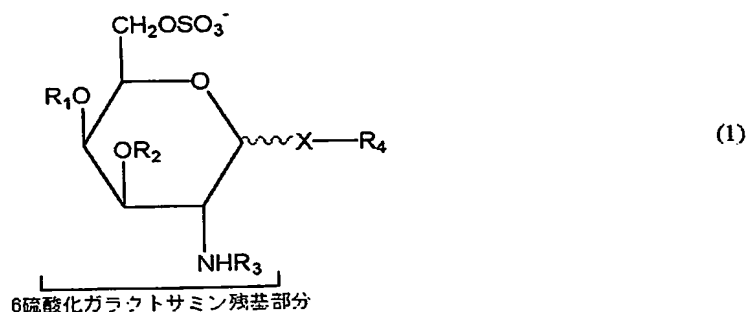
以下、発明の実施の形態により本発明を詳説する。

## (1) 本発明物質

本発明物質は下記式 1 で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体である。

【0011】

【化3】



【0012】

式中 $R_1$ 及び $R_2$ は各々独立に $SO_3^-$ （硫酸基）又はH（水素原子）を示し、 $R_3$ はH、アセチル基又は $SO_3^-$ を示し、 $R_4$ はH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基を示し、XはO、S、NH、 $CH_2$ を示す。

【0013】

本発明物質である式 1 で示される6硫酸化ガラクトサミン誘導体を構成する6硫酸化ガラクトサミン残基部分（上記式中「6硫酸化ガラクトサミン残基部分」と示した部分）は、6硫酸化ガラクトサミン残基の2位のアミノ基がアセチル化又は硫酸化されていても良く、特にアセチル化されていることが好ましい。すなわち $R_3$ はH、アセチル基又は硫酸基が挙げられ、特にアセチル基であることが好ましい。

【0014】

また、6硫酸化ガラクトサミン残基の3位及び4位炭素原子に結合しているヒドロキシル基の水素原子が各々独立に硫酸基に置換していても良いが、前記水素原子の硫酸基による置換がない化合物であることが最も好ましい。すなわち、上記式中 $R_1$ 及び $R_2$ は各々独立に $SO_3^-$ 又はHを示し、各々Hであることが好ましい。

【0015】

式 1 で示される $R_4$ の部分は一般に糖の修飾や保護に用いるアグリコン分子を示

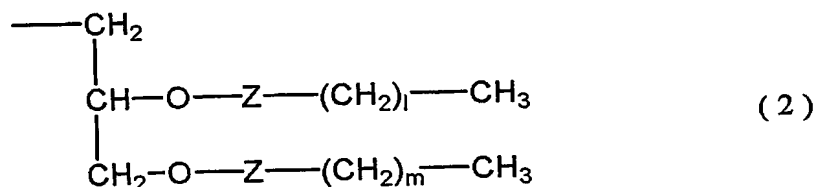
す。そのようなアグリコン分子としてはH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基が挙げられ、アリール基及びアラルキル基が好ましく、特にアリール基が好ましい。

#### 【0016】

上記アルキル基としては例えば炭素数1~23、好ましくは2~20の直鎖又は分枝を有するアルキル基が挙げられ、炭素数2~18の直鎖のアルキル基が好ましいアルキル基として挙げられる。また、アルキル基は、下記式2で示すようなアルキルグリセロール由来の骨格を有するアルコキシアルキル基又はアシルグリセロール由来の骨格を有するアシルオキシアルキル基でも良い（下記構造式中l、mは各々独立に0~18の整数を示し、Zは各々独立にメチレン基又はカルボニル基を示す）。

#### 【0017】

##### 【化4】



#### 【0018】

上記アルケニル基及びアルキニル基は、炭素数1~23、好ましくは2~20であることが好ましく、炭素原子同士の二重結合、三重結合を複数有していても良い。しかし、これらの炭素原子に結合した水素原子は、2以上のアミノ基又は置換を有するアミノ基、及びヒドロキシル基又は置換を有するヒドロキシル基に置換されているものは、その合成工程が煩雑化するため、好ましくはない。

#### 【0019】

上記アシル基とは、一般に-CO-Rで表される基であれば何れでも良いが、アシル基全体で炭素数は1~23、好ましくは2~20である。尚、上記一般式においてRは上述したアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、後述のアリール基、アラルキル基から選択されるいずれかの基である。

#### 【0020】

上記アリール基とは例えばフェニル基、ナフチル基等の芳香族炭化水素残基、又は更にアルキル基、アシル基、ヒドロキシル基 (OH)、ハロゲン原子 (フッ素原子 (F)、塩素原子 (Cl)、臭素原子 (Br)、ヨウ素原子 (I) 等)、ニトロ基 (NO<sub>2</sub>)、硫酸基 (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、アルキル基、アシル基、ケトン基等の置換基が芳香環の水素原子に置換している芳香族残基 (例えばトリル基等) が例示され、この中でも特にフェニル基及びナフチル基が好ましく、特にフェニル基が好ましい。

#### 【0021】

上記アラルキル基とは、前記アリール基 (Ar) にアルキル基が結合した Ar-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- を一般式として表される残基であり、前記 n は 1~20 が好ましく、2~18 がより好ましい。このようなアラルキル基としては、例えばベンジル基、フェネチル基、 $\alpha$ -メチルベンジル基等が例示される。

#### 【0022】

上記式 1 における、「6硫酸化ガラクトサミン残基部分」と R<sub>4</sub> との結合は、「6硫酸化ガラクトサミン残基部分」の 6硫酸化ガラクトサミン誘導体残基の 1 位炭素原子を介したグリコシド結合であり、これは  $\alpha$ -グリコシド結合であっても  $\beta$ -グリコシド結合であっても良い (式 1 中波線で表記した結合)。しかし硫酸基転移酵素を阻害する働きが顕著に強いことから  $\beta$ -グリコシド結合であることが好ましい。また、グリコシド結合には例えば通常のグリコサミノグリカンの基本骨格に存在する O-グリコシド結合の他、O (酸素原子) 部分が S (硫黄原子)、NH (イミノ基)、又は CH<sub>2</sub> (メチレン基) に各々置換した S-グリコシド結合、N-グリコシド結合、及び C-グリコシド結合も存在し、これらのグリコシド結合であっても良い。しかし、本発明物質においては特に O-グリコシド結合であることが好ましい。すなわち、上記式中 X は O、S、NH 及び CH<sub>2</sub> が例示されるが、O が最も好ましい。なお、糖を構成する六員環はフネ型とイス型の何れもが存在しうるが、本発明物質においては安定性の面からイス型が好ましい。しかしこれに限定はされない。

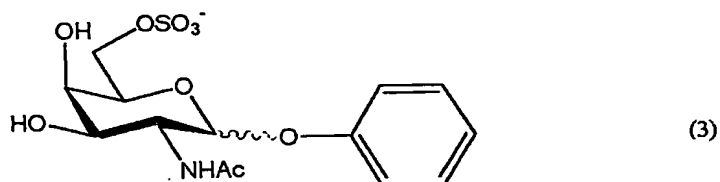
#### 【0023】

従って、最も好ましい 6硫酸化ガラクトサミングリコシド誘導体は、下記式 3 で示される物質である。



【0024】

【化5】



【0025】

式中、Acはアセチル基を示す。波線は、6硫酸化ガラクトサミン残基部分へのグリコシド結合の様式である $\alpha$ 及び $\beta$ を示す。便宜上 $\alpha$ 結合している上記式3で表される本発明物質を「本発明物質1」と表記し、 $\beta$ 結合している上記式3で表される本発明物質を「本発明物質2」と記載する。

【0026】

本発明物質1及び2は例えば以下の方法で調製することができる。

すなわち、フェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-D-ガラクトピラノシドを乾燥ピリジンに溶解し、これに三酸化硫黄ピリジン錯体を添加して反応させることができる。反応後、イオン交換を行い、これを濃縮することで本発明物質1又は2を得ることができる。このようにして得られる本発明物質は粗精製物となるため、これを更にイオン交換樹脂を用いたクロマトグラフィーやゲル濾過法等の分子量により化合物を分離する方法を用いて精製することが可能である。

【0027】

このようにして得られる本発明物質は、硫酸基転移酵素（特にJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の硫酸基転移酵素）及び当該酵素の基質（硫酸基供与体及び硫酸基受容体）と共存させて、硫酸基転移酵素の酵素活性を阻害するための下記本発明阻害剤として使用することができる。

【0028】

(2) 本発明阻害剤

本発明阻害剤は本発明物質を含み、硫酸基転移酵素の活性を阻害する。

本発明阻害剤における硫酸基転移酵素とは硫酸基供与体から硫酸基受容体に硫酸基を転移する働きを有する酵素であり、特にグリコサミノグリカンの基本骨格

に存在するヘキシサミン残基に対して硫酸基を転移する酵素であることが好ましい。このような酵素としては特開平10-33168号、特開2001-57882号、J. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900、特開2000-60566号、W002/00889号、特開平8-33483号記載の酵素が例示され、その中でも特にコンドロイチン硫酸に存在するガラクトサミン残基に対して硫酸基を転移する酵素であるコンドロイチン6-硫酸基転移酵素（特開平10-33168、特開2001-57882号、J. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900）が好ましく、最も好ましくはJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の酵素（コンドロイチン硫酸に存在する4硫酸化ガラクトサミン残基の6位ヒドロキシル基に対して硫酸基を転移する活性を有する酵素）が例示される。

#### 【0029】

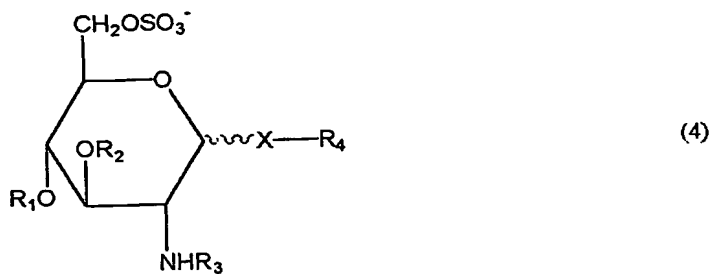
本発明阻害剤の酵素活性の阻害とは、本発明阻害剤を添加しない反応系（対照）での酵素活性を100%、酵素を添加しない系（陰性対照）での酵素活性を0%とした場合に、酵素活性が5%以上低下する現象を指称する。本発明阻害剤は特に後述の実施例2記載の阻害活性の測定方法に従って阻害活性を測定した際に、2.5mMの阻害剤濃度での反応時において5%以上、好ましくは10%以上、最も好ましくは15%以上の阻害活性を示す。

#### 【0030】

なお、特に特開2000-60566号、W002/00889号、及び特開平8-33483号に記載されたヘパリン骨格（ヘパリンやヘパラン硫酸が有するグルコサミンとウロン酸（グルクロン酸、イズロン酸）の二糖の繰り返し構造からなる糖鎖骨格）中のグルコサミン残基の6位ヒドロキシル基へ硫酸基を転移する酵素の活性も本発明阻害剤は阻害する可能性もあると考えられるが、下記式4記載の化合物が更に強い阻害活性を示すと考えられ、同様に下記式5記載の化合物は当該グルコサミン残基の2位アミノ基に硫酸基を転移する酵素（例えばJ. Biol. Chem., 273(1998), pp.2556-2559記載の酵素など）の活性を阻害すると考えられる。

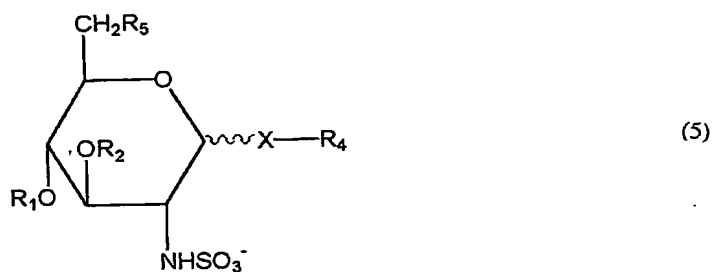
#### 【0031】

## 【化6】



【0032】

## 【化7】



【0033】

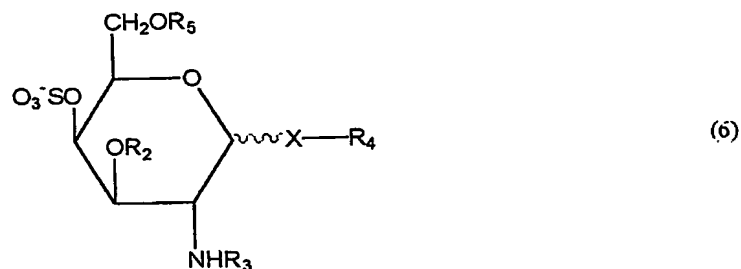
式中 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 及び $X$ は上述した式1と同じであり、 $R_5$ は $SO_3^-$ 又は $H$ を示す。

【0034】

また、更にコンドロイチンの基本骨格に存在するガラクトサミンの4位炭素原子に結合したヒドロキシル基を硫酸化する働きを有する酵素（例えば特開2001-61481号記載の酵素）に対しては、下記式6記載の物質が強い阻害活性を示すと考えられる（ $R_5$ が $SO_3^-$ である下記式6の化合物は本発明物質に含まれる化合物である）。

【0035】

## 【化8】



出証特 2003-3076949

4.23-4.27 (m, 2H)

5.44 (d, 1H, J=, a-H-1)

7.00-7.04 (m, 3H)

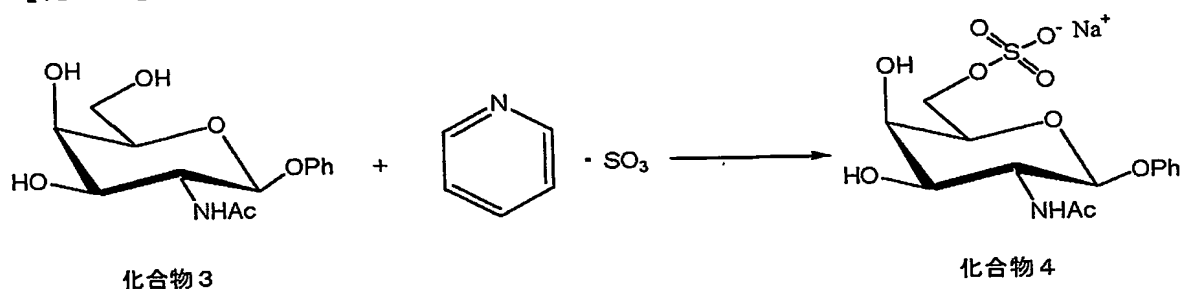
7.24-7.28 (m, 2H)

【0041】

(2) 本発明物質2の調製

【0042】

【化10】



【0043】

フェニル2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシド (化合物3) 6.8mg (0.023mmol) を乾燥ピリジン3.0cm<sup>3</sup>に溶解し、三酸化硫黄ピリジン錯体8.0mg (0.050mmol) を添加して30℃で60時間攪拌した。反応混合液にメタノールを1.5cm<sup>3</sup>添加し、イオン交換樹脂Na<sup>+</sup>型を通過させた。溶出液を遠心分離して不用物を除去した後、減圧濃縮し、化合物4 (本発明物質2) 12.6mgを得た。化合物4をイオン交換樹脂を用いて高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した。このようにして調製した本発明物質2を<sup>1</sup>H-NMRで分析した。なお、上記化学式中「Ph」はフェニル基を示す。

【0044】

(化合物4)

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz、D<sub>2</sub>O)

δ (ppm)

1.88 (s, 3H, NHC(=O)CH<sub>3</sub>)

3.72 (d, 1H, J=11.5Hz, H-3)

3.93 (s, 1H, H-4)

3.97-4.15 (m, 4H, H-6, H-5, H-2)

4.94 (d, 1H,  $J=8.3\text{Hz}$ ,  $\beta\text{-H-1}$ )

6.94-7.03 (m, 3H)

7.22-7.28 (m, 2H)

#### 【0045】

##### 実施例 2

酵素活性の測定はJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の方法を改変して行なった。標準反応液は50 $\mu\text{l}$ 中に、2.5 $\mu\text{mol}$ のイミダゾール-HCl (pH6.8)、0.5 $\mu\text{mol}$ のCaCl<sub>2</sub>、1 $\mu\text{mol}$ の還元型グルタチオン、ガラクトサミン換算で25nmolのコンドロイチン硫酸A (クジラ軟骨由来: 生化学工業株式会社製)、50pmolの[<sup>35</sup>S]PAPS (活性硫酸: 約 $5.0 \times 10^5\text{cpm}$ : Anal. Biochem., 148(1985), 303-310に従って調製した)、及びJ. Biol. Chem., vol.276, 43894-43900記載の方法で調製したヒト由来のN-アセチルガラクトサミン4-硫酸6-O-硫酸基転移酵素を添加した。この反応系に実施例1で調製した本発明物質1、本発明物質2を最終濃度1.0mM、2.5mMとなるように添加して反応を開始した。

#### 【0046】

反応は、反応液を37℃で20分間インキュベートして行い、反応の停止は1分間反応チューブを沸騰水中で加熱して行なった。反応停止後、1.3%酢酸カリウムを含むエタノールを3倍量添加し、<sup>35</sup>Sラベルされたグリコサミノグリカンを沈殿させ、J. Biol. Chem. 268, 21968-21974に記載された方法で高速脱塩カラムを用いたゲルクロマトグラフィーを行って、その後、シンチレーションカウンターで放射能を測定した。陰性対照として酵素を添加しない反応系を用いた。

本発明物質を添加しない系を陽性対象として100%の酵素反応とし、本発明物質を添加した系での酵素反応の相対値を算出した (図1)。

#### 【0047】

その結果、本発明物質1、本発明物質2共に終濃度2.5mMの反応系では阻害活性が観察され、特に本発明物質2の阻害活性が強かった。本発明物質2は終濃度1.0mMで添加した際に40%以上の阻害活性が観察され、終濃度2.5mMの際には50%以上の阻害活性が観察された。一方、本発明物質1は終濃度1.0mMで添加した際に

は阻害活性が観察されなかったが、終濃度2.5mMの際には15%以上の阻害活性が観察された。

【0048】

【発明の効果】

本発明により硫酸基転移酵素の阻害活性を有する6硫酸化ガラクトサミングリコシド誘導体及びそれを用いる硫酸基転移酵素阻害剤が提供される。

【0049】

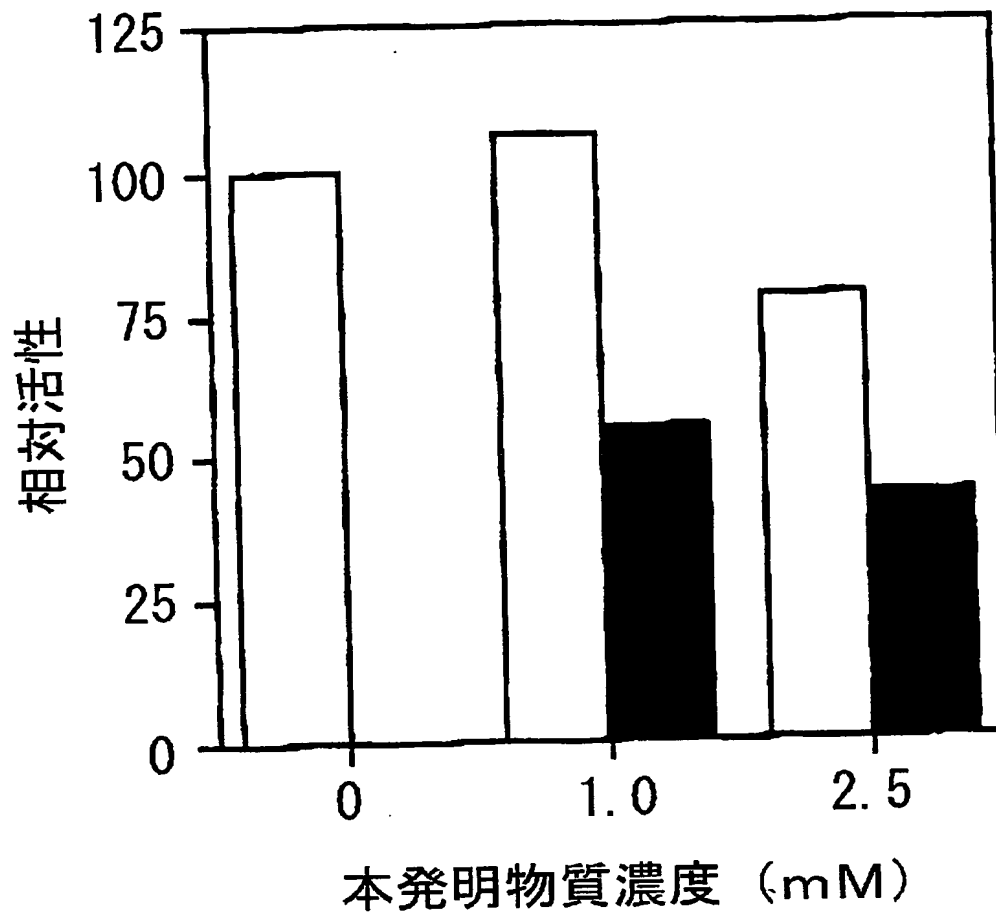
【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明物質のN-アセチルガラクトサミン4-硫酸6-O-硫酸基転移酵素阻害活性を示す図である。

【書類名】

図面

【図1】





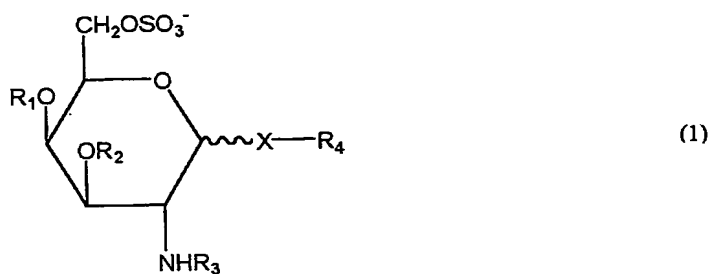
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コンドロイチン硫酸Eを合成する働きを有するコンドロイチン4硫酸-6硫酸基転移酵素を阻害する働きを有する化合物を提供する。

【解決手段】 下記式1で表されることを特徴とするガラクトサミン誘導体及び当該ガラクトサミン誘導体を硫酸基転移酵素阻害剤として使用する。

【化1】



式中 $R_1$ 及び $R_2$ は各々独立に $SO_3^-$ 又はHを示し、 $R_3$ はH、アセチル基又は $SO_3^-$ を示し、 $R_4$ はH、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アシル基、アリール基、又はアラルキル基を示し、XはO、S、NH、 $CH_2$ を示す。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号

特願 2002-201843

受付番号

50201012710

書類名

特許願

担当官

第五担当上席

0094

作成日

平成14年 7月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成14年 7月10日

次頁無

特願2002-201843

出願人履歴情報

識別番号

[000195524]

1. 変更年月日

1990年 8月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

氏 名

生化学工業株式会社